

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 检测试剂盒 (分光光度法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

细胞色素 P450 酶是一组主要存在于肝脏的同工酶，在外源物质代谢中具有重要作用，尤其是药物和毒物的代谢。NCR 作为 P450 酶系的重要一员，催化氧化型 P450 还原再生。

测定原理：

NCR 催化 NADPH 还原氧化型细胞色素 c 生成还原型细胞色素 c，还原型细胞色素 c 在 550nm 处有特征吸收峰；通过测定 550nm 吸光度的增加速率，来计算 NCR 活性。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。临用前配制，加 2.6 mL 蒸馏水充分溶解，4℃ 保存。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前配制，加 550 μL 蒸馏水充分溶解，4℃ 保存。

粗酶液提取：

- 1、除去细胞核和线粒体等：**称约 0.5g 组织，加入 4℃ 预冷的 1 mL 试剂一，冰上充分研磨，10 000g 4℃ 离心 30min，取上清液，转移到超速离心管中。
- 2、粗制微粒体：**4℃，100 000g，离心 60min，弃上清液。
- 3、除血红蛋白等杂质：**向步骤 2 的沉淀中加 1 mL 试剂一，盖紧后充分震荡溶解，100 000g 离心 30min，弃上清液。
- 4、最终微粒体：**向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5 mL，盖紧后充分震荡溶解，4℃ 保存待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 550 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 37°C 水浴中预热 30min。
3. 空白管: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 **50μL 蒸馏水**、900μL 试剂二、50μL 试剂三和 10μL 试剂四, 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化, 第 10 s 和第 130 s 吸光值分别记为 A1 和 A2, ΔA 空白管=A2-A1。
4. 测定管: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 **50μL 粗酶液**、900μL 试剂二、50μL 试剂三和 10μL 试剂四, 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化, 第 10 s 和第 130 s 吸光值分别记为 A3 和 A4, ΔA 测定管=A4-A3。

注意: 空白管只需测定一次。

计算公式:

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义: 37°C 中, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NCR 酶活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 529 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义: 37°C 中, 每克样品每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NCR 酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 265 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{W} \end{aligned}$$

ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 反总: 反应体系总体积, 1010μL=0.00101L;

Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定;

V 样: 加入反应体系中上清液体积, 50μL=0.05mL;

V 样总: 加入提取液体积, 0.5mL;

W: 样本质量, g;

T: 反应时间, 2min。

注意事项:

试剂三、试剂四临用前配制, 配好未使用完的 4°C 可保存两天。